



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijski odsjek

Boris Gomaz

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

SAN O PLAVOJ RUŽI

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za opću i anorgansku kemiju

Mentor rada: prof. dr. sc. Višnja Vrdoljak

Zagreb, 2018. godina.

Datum predaje prve verzije Završnog rada:

1. kolovoza 2018.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

5. rujna 2018.

Mentor rada: prof. dr. sc. Višnja Vrdoljak

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. KAROTENOIDI	II
2.1. Biogeneza karotenoida u cvijetu ruža	iv
2.1.1. Dehidrogenacija.....	v
2.1.2. Ciklizacija	v
2.1.3. Hidroksilacija.....	v
2.1.4. Epoksidacija.....	v
2.1.5. Transformacija epoksida.....	vi
2.2. Katabolizam karotenoida	vi
2.3. Bijela ruža.....	viii
§ 3. ANTOCIJANINI.....	X
3.1. Biogeneza antocijanina	xi
3.1.1. Pelargonin.....	xii
3.1.2. Cijanin.....	xii
3.1.3. Peonin	xiii
3.2. Pigmenti šipka	xiv
§ 4. STABILIZACIJA I KOPIGMENTACIJA	XV
4.1. Kopigmentacija	xvii
§ 5. PLAVA RUŽA	XXI
§ 6. ZAKLJUČAK	XXV
§ 7. LITERATURNI IZVORI.....	XXVI

§ Sažetak

Ovim radom predstavlja se pregled pigmenata izoliranih iz ruža, odnosno njihovih šarolikih cvjetova. Žuta boja i njene nijanse proizlaze od karotenoida, crvena i ljubičasta produkti su antocijanina, dok narančasta može biti i jedno i drugo ili pak kombinacija. Također može se uvidjeti strukturalna raznolikost koja se pojavljuje u prirodi, karotenoida ima mnogo više nego što ima antocijanina. Razlog tome može se priložiti sama biosinteza karotenoida koja započinje od lančanog spoja pa se reakcijama hidroksilacije, epoksidacije i transformacije epoksida dorađuje. Ruže koje sadržavaju karotenoide su obično veoma mirisne, čemu u prilog ide razgradni put ($C_{40} \rightarrow C_{13} + C_{27} \rightarrow C_{13} + C_{14}$) kojim kao što vidimo nastaje C_{13} mirisna jedinica.

Kada se govori o antocijaninima, oni su više zaslužni za samu boju cvijeta, nego je to slučaj kod karotenoida. No, kako bi se ta boja stabilizirala, u prirodi se pojavljuju kompleksi pigment/kopigment čime se predstavlja pojam kopigmentacije. Ovakve nekovalentne supramolekulske strukture proučavane su posljednjih desetljeća kako bi se na molekularnoj razini objasnila kopigmentacija. Ovim radom opisuje se priroda interakcija aromatskih prstenova, odnosno pokušava se razriješiti pitanje radi li se o interakcijama između π -konjugiranih sustava ili pak o vodikovim vezama koje nastaju između donorskih i akceptorskih skupina pigmenta i kopigmenta. Uslijed nastajanja ovakvih vrsta interakcija postavlja se pitanje je li moguće postojanje ruže sa slike 1.



Slika 1: Obojana plava ruža

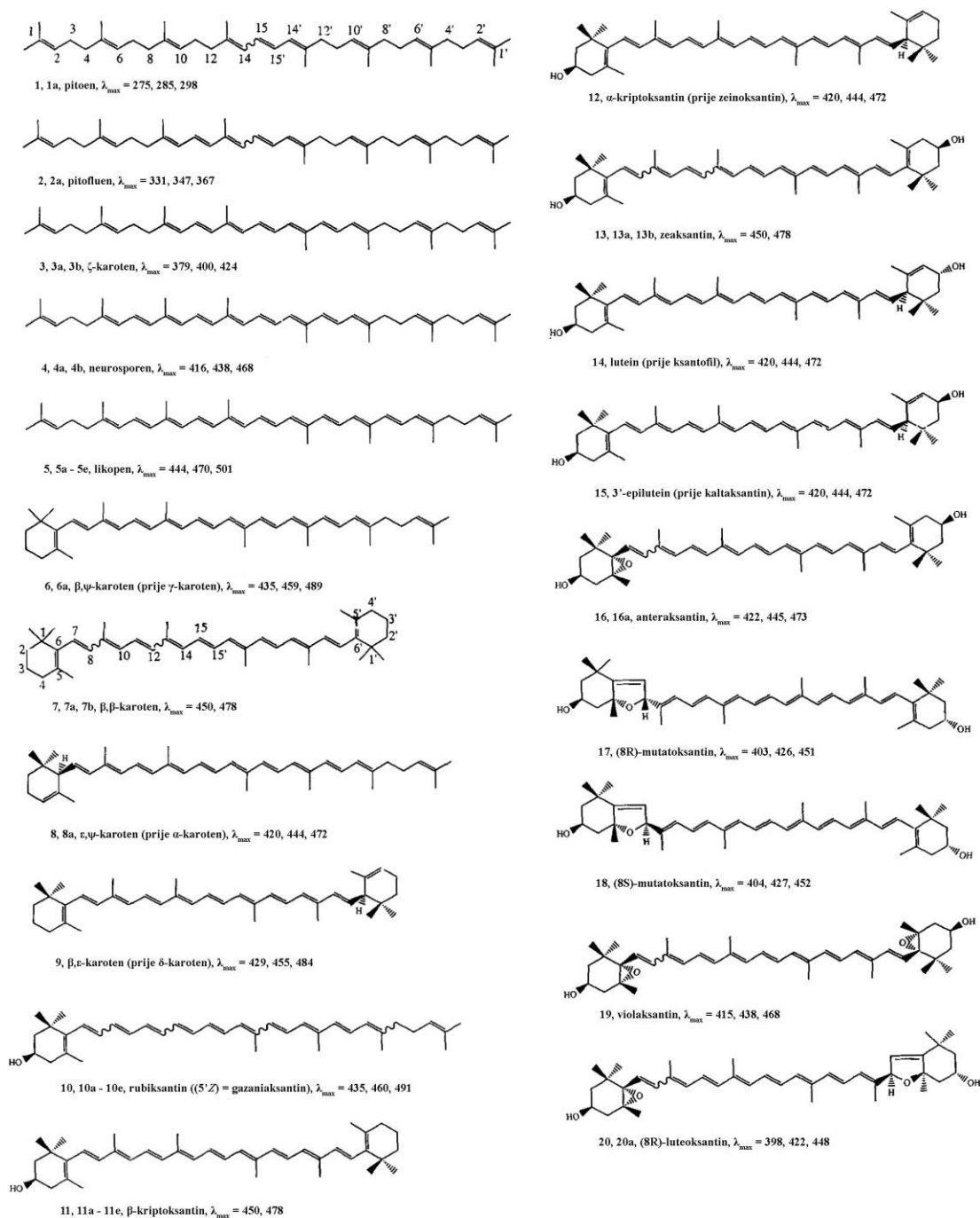
§ 1. UVOD

Ruže imaju, sa svojim prekrasnim cvjetovima raznih boja, rezervirano posebno mjesto u vrtu. Priča o boji započinje apsorpcijom elektromagnetskog zračenja. Organski spojevi, u čijoj strukturi je sadržan π -konjugirani sustav, određuju pigment ruže ili nekog drugog cvijeta. Apsorpcijski maksimumi (λ_{\max}) takvih π -konjugiranih sustava se određuju uporabom klasične apsorpcijske kromatografije te ako se oni nalaze u vidljivom djelu spektra, boja ruže odgovara komplementarnoj boji kojoj odgovara maksimum. Danas je poznat veliki broj spojeva koji pripadaju pigmentima (karotenoidi, antocijanini, malvin...), ali neki od tih spojeva nisu stabilni. Istraživanja su pokazala kako su u takvim situacijama potrebni neki drugi pigmenti ili kofaktori kao stabilizatori, potrebna je kopigmentacija.

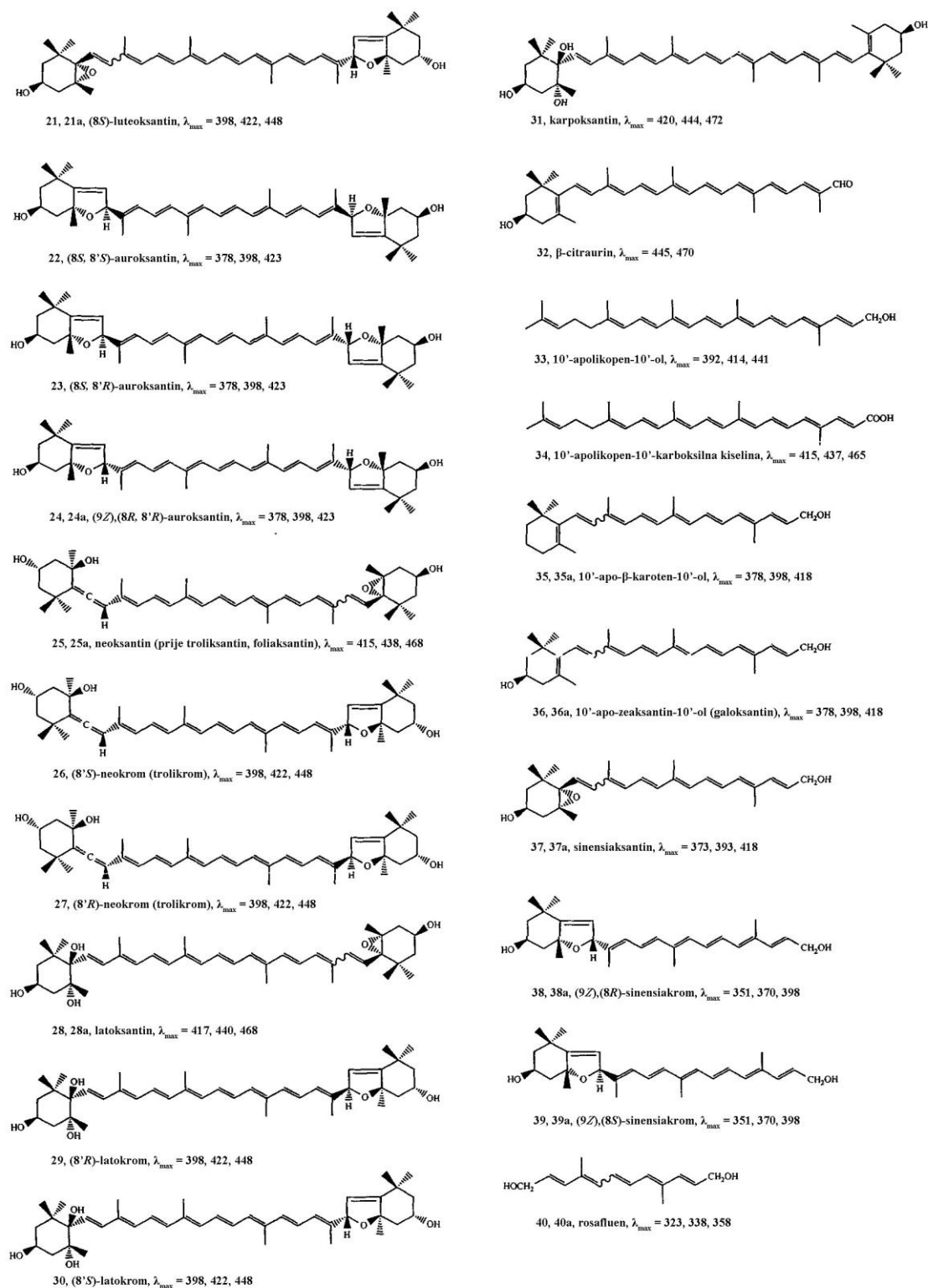
Kopigmentacija se može definirati kao (i) nastajanje (uz prisutnost ili u odsustvu metalnog iona) kompleksa koji uključuje pigment (npr. antocijanin ili derivat antocijanina) i kopigment i (ii) posljedično tome, promjena optičkih svojstava samog pigmenta.¹ Sama kopigmentacija ovisi o strukturi pigmenta te o pH vrijednosti okoline u kojoj se nalazi. Sukladno tome kopigmenti bi trebali u svojoj strukturi imati π -konjugirani sustav i donorske/akceptorske skupine koje će stvarati vodikove veze s takvim skupinama u strukturi pigmenta.

Većina danas poznatih ruža dobiveno je od divlje ruže, pa procesima hibridizacije, mutacije i selekcije dolazimo do broja takovih vrsta koji iznosi više od 50000.² Ovakve ruže imale su ulogu u povijesti, arhitekturi, umjetnosti, književnosti,³ ili pak kao ukras na stolu prilikom svečanih događanja. Različitim tehnikama dobivene su žute, narančaste, crvene, ljubičaste i zelene ruže, ali ne postoji ruža plave boje. Dapače, iz biljaka se mogu izolirati razni pigmenti, klorofil iz listova, karotenoidi, antocijanini, malvin... iz latica, krizantemin (crna boja) iz šipka ruže. Neki od navedenih pigmenata detaljnije će biti opisani u sljedećim odjeljcima.

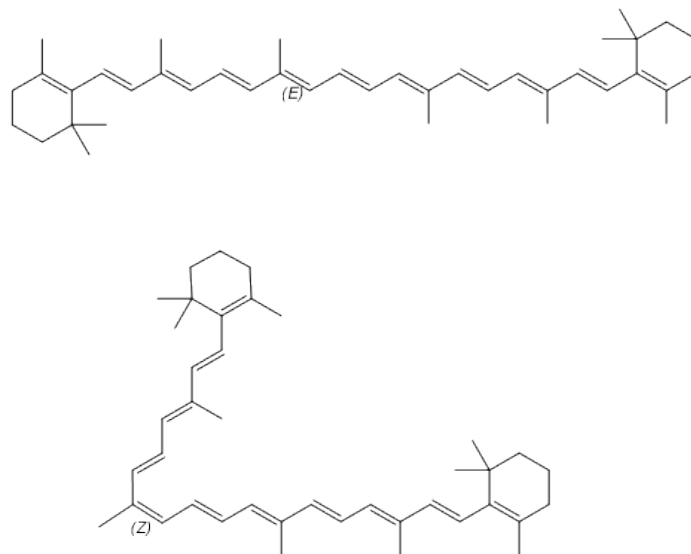
§ 2. KAROTENOIDI



Slika 2: Karotenoidi izolirani iz ruža i pripadajuće vrpce u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra ($\lambda_{\max} / \text{nm}$)²

Slika 3: Nastavak slike 2²

Karotenoidi su spojevi koji su istraživani, zbog svoje važnosti u različitim biološkim funkcijama, još od početka 19. stoljeća.⁴ Istraživanja su uzela maha 1930. godine kada je Paul Karrer odredio strukture likopena i β -karotena. Broj otkrivenih struktura karotenoida raste svake godine, linearno te prema ovim podacima, dolazimo do broja koji danas iznosi preko 1100 različitih struktura.⁵ Na slikama 2 i 3 prikazane su molekulske strukture karotenoida izoliranih iz ruža te njihovi pripadni apsorpcijski maksimumi. Molekulske strukture označene brojem i slovom označavaju spojeve *Z*-strukture, a molekulske strukture bez slova označavaju *E* izomere. Položaj dvostruke veze *E* konfiguracije označen je valovitom crtom. Kao primjer takvih struktura posebno je izdvojen β,β -karoten (slika 4). Može se uočiti da neke strukture posjeduju epoksidnu skupinu (22, 23, 24) u čijim samo *E*-konfiguracijama uočavamo 20 diastereoizomera, ako spoj posjeduje samo jednu *Z* dvostruku vezu, broj enantiomernih parova se povećava. Tehnike korištene kako bi se identificiralo 40 uzoraka sa slika 2 i 3 su HPLC, spektroskopija UV/VIS; NMR, masena spektrometrija i cirkularni dikroizam. Ovim tehnikama moguće je identificirati spojeve koji su prisutni samo u tragovima kod izolacije iz organskog materijala.



Slika 4: Primjer *E/Z* izomerije koja se javlja u prirodnim spojevima kao što je β,β -karoten

2.1. Biogeneza karotenoida u cvijetu ruža

Biogeneza, u ovom slučaju, govori o najvažnijim koracima biosintetskog puta karotenoida i transformaciji molekule kako bi nastao željeni spoj. U daljnjim odjeljcima pobliže su opisani koraci sinteze. Biosinteza svih spojeva koji pripadaju karotenoidima započinje iz

aceta-CoA, čijom nadogradnjom nastaje pitoen (spoj broj 1 na slici 2) iz C₄₀ jedinice. Prilikom izolacije spoja, identificirani su i (15-*Z*)-1 i (15-*E*)-1, dok su ostale dvostruke veze u njemu sve *E*-konfiguracije. No, daljnjim izolacijama spojeva u putu sinteze uočeni su spojevi koji imaju *Z/E*-izomeriju na drugim C atomima, što dovodi do zaključka da postoji više biosintetskih puteva u kojima svaki od njih imaju *Z/E*-izomere kao intermedijere.

2.1.1. Dehidrogenacija

U procesima dehidrogenacije, ako polazimo od spoja 1, dolazimo do spojeva 2-5. Svakim sljedećim korakom nastaje dodatna dvostruka veza kako bi se povećao π -konjugirani sustav. Spojevi 2 i 3 pretežito su izolirani iz bijelih ruža što inducira njihov nedostatak obojenja, dok su spojevi 4 i 5 obojeni, ali se u ružama pojavljuju u kratkom vremenskom intervalu. Ovakva opažanja ukazuju na prazninu u paleti boja zbog apsorpcijskih maksimuma ovih spojeva, ali i upućuju na zaključak da se spojevi 4 i 5 veoma brzo troše u sljedećem koraku ciklizacije.

2.1.2. Ciklizacija

U prethodnom koraku utvrđeno je kako je likopen najvažniji supstrat nastanka cikliziranih spojeva, no nije jedini. Ciklizacijom spojeva 4 i 5 nastaju produkti koji imaju različite prstenaste strukture (β i ϵ). Jedini mogući zaključak iz ovakvih opažanja je taj da spoj 6 nastaje ciklizacijom (5*E*)-likopena, a spoj 8 nastaje ciklizacijom (5*Z*)-likopena. Mnogi eksperimenti pokazali su kako metilna skupina na C(5) atomu ne mijenja svoju konfiguraciju prilikom kataliziranog zatvaranja prstena.^{6,7} U nastalom prstenu javlja se C(6) kiralni centar koji je *R* konfiguracije u svim višim biljkama.

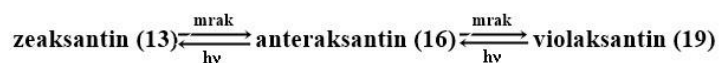
2.1.3. Hidroksilacija

Reakcija hidroksilacije javlja se kod ruža samo u spojevima koji imaju ciklički kraj u svojoj strukturi. Spojevi sa β prstenom posjeduju isključivo 3*R* kiralnost, a spojevi sa ϵ prstenom posjeduju obrnutu konfiguraciju. Primjene li se CIP-pravila na spomenuti kiralni centar sa hidroksilnom skupinom na C(3') atomu u ϵ prstenu, dobiva se zaključak kako on također ima 3*R* konfiguraciju. Zasad ne postoje indikacije da proces hidroksilacije može nastupiti u nekom sljedećem koraku biogeneze karotenoida.

2.1.4. Epoksidacija

Spojevi 16 i 19 koji imaju 5,6-epoksidnu skupinu, se pojavljuju u većem broju ruža. Proces epoksidacije odvija se preferentno na spojevima koji imaju hidroksilnu skupinu na β

prstenu u svojoj strukturi. Kisikov atom u epoksidnoj skupini dolazi iz molekule O₂, a u strukturu spoja dolazi preko takozvanog „violaksantin“ ciklusa (slika 5).⁸



Slika 5: „Violaksantin“ ciklus²

Uočeno je zatim da žute ruže posjeduju veliku količinu epoksidnih spojeva, više od 80%, čime se zaključuje da spojevi sa hidroksilnom skupinom ne utječu na apsorpciju svjetla (ruže ostaju narančaste), a epoksidni spojevi pomiču apsorpcijske maksimume prema manjim valnim duljinama. U isto vrijeme, proces epoksidacije čini molekulu reaktivnijom, što znači da su epoksidi nestabilni u kiselom mediju.

2.1.5. Transformacija epoksida

Reakcija od 5,6-epoksida do 5,8-epoksida katalizirana prisutnošću kiseline jedna je od važnijih reakcija transformacija u ruža. Prilikom reakcije konfiguracija C(5) atoma se ne mijenja, ali istovremeno nastaje novi kiralni centar na C(8) atomu. Svim neenzimski kataliziranim reakcijama nastaju diastereoizomeri. Mješavina ovakvih spojeva lako se reakcijama peroksidacije i preuređivanja prevodi u lakton, koji npr. pridonosi aromi čaja.² Spomenuto smanjenje apsorpcijskih maksimuma u odjeljku 2.1.4. dolazi još više do izražaja prilikom ovakve transformacije epoksida i mijenja se boja iz žute u zelenožutu.

2.2. Katabolizam karotenoida

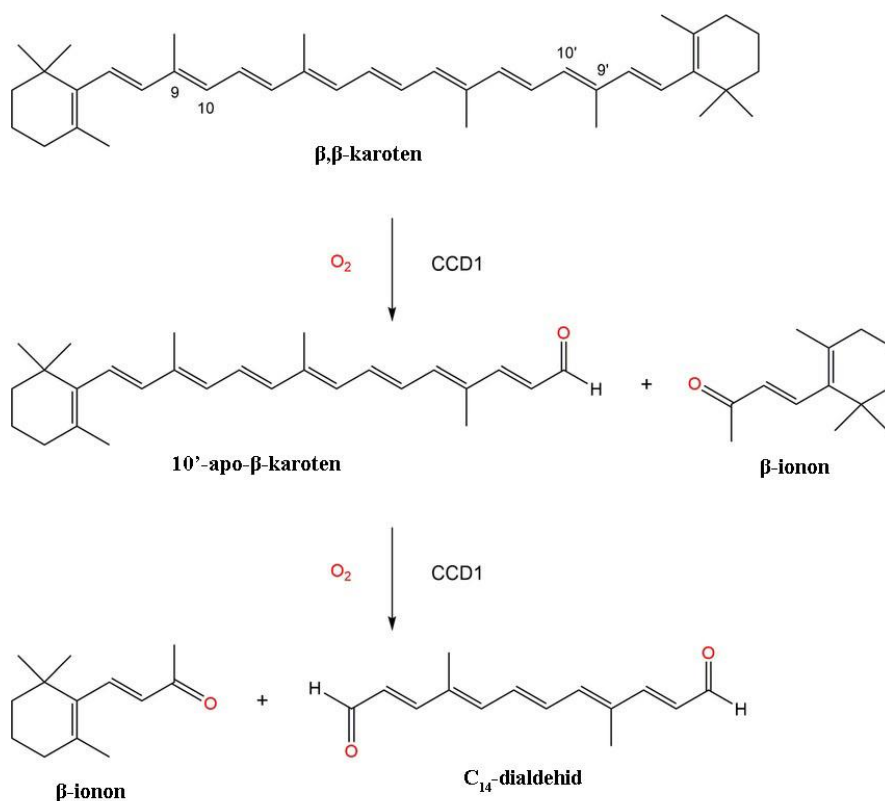
Cvjetovi ruža mogu poslužiti kao izvor spojeva koji nastaju razgradnjom karotenoida, apokarotenoida, čije strukture se nalaze na slici 3, brojevi od 32 do 40. Karotenoidi su spojevi koji sadrže 40 C atoma u svojoj molekulskoj strukturi, a njihovom razgradnjom dobivaju se jedinice od 13, 14 i 27 C atoma. Ovakvi spojevi mogu, isto kao i karotenoidi, pridonijeti boji cvijeta ruže.



Slika 6: „Maréchal Niel“, penjačica, *Pradel*, 1864, najpoznatija od starih žutih ruža²

Primjer ovakvog bojanja cvijeta ruže je ruža sa slike 6. Ako se ona uzgaja u stakleniku, iz nje se može izolirati spoj 33 i ruža je žute boje, a prilikom uzgaja na direktnom suncu, iz nje se može izolirati spoj 34, a u cvijetu ima malih naznaka zelene boje.² Sa slike 3 može se vidjeti kako spoj 33 ima u svojoj strukturi alkoholnu skupinu koja na suncu, reakcijama oksidacije, prelazi u karboksilnu skupinu. Ovakvom reakcijom dolazi do promjene apsorpcijskog maksimuma spoja pa dolazi i do promjene boje.

Gore već spomenuti spojevi skoro su svi građeni od C_{27} jedinice. Ti apokarotenoidi nastaju cijepanjem početnih spojeva na $C(9)$ i/ili $C(9')$ atomu i pritom nastaju pripadni alkoholi, a ne aldehidi. Kao dokaz tome može se priložiti Car(15,15') dioksigenaza. Ovaj enzim cijepa β,β -karoten na dva retinala (C_{20} jedinice). Takav spoj se ne skladišti nego se reducira u pripadni alkohol i nastaje Vitamin A. Sukladno tome može se zaključiti da kod degradacije karotenoida u ruža nastaju aldehidi, koji se brzo prevode u alkohole.⁹ Prema reakcijama koje su prikazane na slici 7 moguće je vidjeti da enzim dioksigenaza cijepa β,β -karoten najprije na C_{27} i C_{13} jedinice, a zatim jedinicu od 27 C atoma još jednom cijepa na C_{14} i C_{13} jedinice. Cijepanje π -konjugiranog sustava vrši se na 9,10 te 9',10' dvostrukoj vezi. Gore opisanim reakcijama dolazi se do aldehida koji se kod ruža brzo prevode u alkohole što se zaključuje iz nemogućnosti izolacije pripadajućih aldehida.



Slika 7: Raspad β,β -karotena na pripadajuće apokarotenoide različitog molekuskog sastava¹⁰

Već spomenute jedinice C_{27} nastale djelovanjem enzima Car(9,10:9',10') dioksigenaza nisu krajnji produkti razgradnje karotenoida već nastaju C_{13} i C_{14} jedinice. Ovakvi spojevi acilnih alkohola i ketona također se detektiraju u cvijetu ruža, uz pomoć plinske kromatografije pošto nisu skladišteni kao glikozilirani produkti.

Prema svemu gore opisanom u prethodnim odjeljcima, karotenoidi služe samo kako bi cvijeće bilo obojano, odnosno kako bi privuklo insekte koje će ih oprášiti. Uloga karotenoida nije samo takva već se njihovom razgradnjom dobivaju arome i drugi spojevi različitih fizioloških svojstava. Poznavajući zatim mehanizam fotosinteze, odnosno informaciju da kompleks za sakupljanje svjetlosti sadrži karotenoide, možemo uvidjeti da karotenoidi imaju ulogu u prijenosu elektrona kroz svoj π -konjugirani sustav.¹¹ Sve u svemu, karotenoidi su polifunkcionalna skupina spojeva i kao takvi prednjače ispred svih prirodnih skupina spojeva.

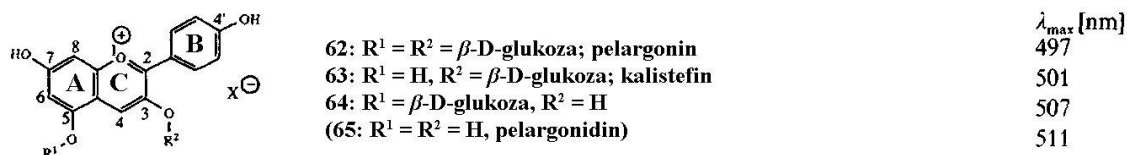
2.3. Bijela ruža

Latice bijelih ruža reflektiraju veliku količinu svjetlosti koja dostiže do njih, dakle one su više-manje slobodne od spojeva koji apsorbiraju svjetlost valnih duljina između 400 nm i 700 nm. Bez obzira na njihovu prirodu apsorpcije svjetlosti, one nisu prozirne, a to se može

zahvaliti unutarstaničnom prostoru koji je ispunjen zrakom te se nalazi između samih stanica. Ako se laticе bijelih ruža stave u aceton, zrak iz unutarstaničnog prostora izlazi van, a sjaj ruža i refleksija zračenja su znatno smanjeni. Zaključuje se kako bijele ruže posjeduju pigmente, ali oni apsorbiraju zračenje u UV području elektromagnetskog zračenja. Pored svih flavanoida i njegovih glikoziliranih derivata, detektirane su i znatne količine karotenoida. Od karotenoida koji su izolirani iz bijelih ruža dominiraju bezbojni lančani π -konjugirani sustavi, a ostali izolirani spojevi su epoksidi ili obojeni karotenoidi. U prijašnjim odjeljcima je navedeno kako ovi ostali izolirani spojevi imaju određene apsorpcijske maksimume koji odgovaraju žutoj ili narančastoj boji pa se zaključuje kako su oni vjerojatno izolirani iz baze latica ruža kojoj odgovaraju ovakve boje. U bijelim ružama također je moguća prisutnost apokarotenola koji su produkti kataboličkog puta u biljkama te oni u ponekim slučajevima djeluju kao pojačivači svjetline samih ruža, odnosno postotak bjeline se povećava.

U cvjetovima nekih bijelih ruža može biti naznaka zelene boje. Takve biljke imaju uz karotenoide i nešto klorofila u svojim laticama. Ako se ode u krajnost kada govorimo o pigmentima, postoje ruže koje su u potpunosti zelene. Dakle, takvi rijetki primjerci, uz listove i stabljike koji su zeleni ima i zelene cvjetove. Za zelenu boju koja se prožima kroz cijelu biljku zasigurno je zaslužan klorofil.

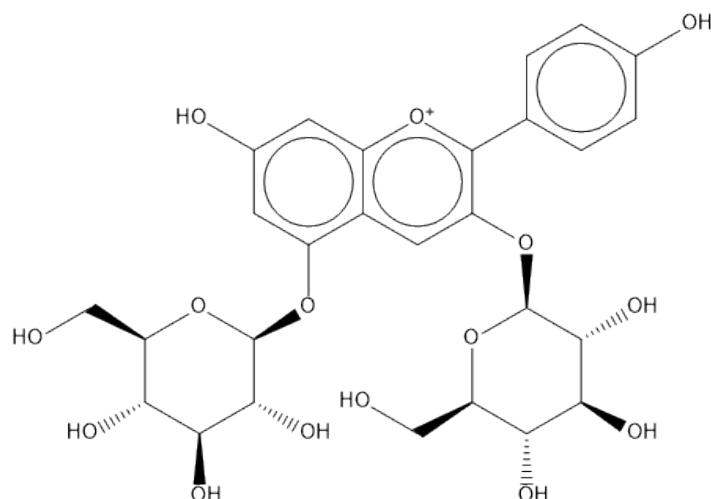
§ 3. ANTOCIJANINI



Slika 8: Antocijanini izolirani iz ruža i pripadajuće vrpce u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra (λ_{\max} / nm)²

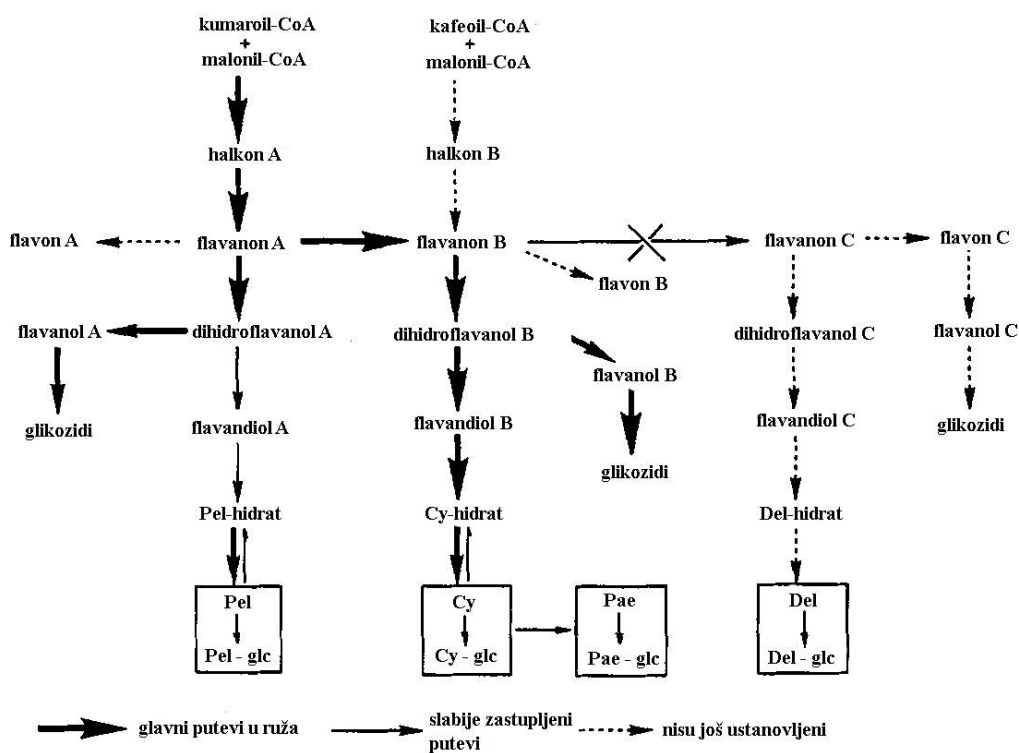
Antocijanini su vrsta spojeva koja puno više doprinose boji ruže od karotenoida čija uloga je puno veća. Boja same ruže, kada su u pitanju antocijanini, može jako varirati zbog toga što ti spojevi apsorbiraju svjetlost u puno većem dijelu spektra. Ovdje govorimo o narančastoj, koja se slučajno može zamijeniti sa narančastom bojom karotenoida, preko crvene pa sve do ljubičaste. Istraživanja koja su započela još davne 1915. izolacijom cijanina pokazala su kako se ova vrsta spojeva ponaša bitno drugačije od karotenoida, hidrofilne su molekule i otapaju se u staničnom soku biljke.¹²

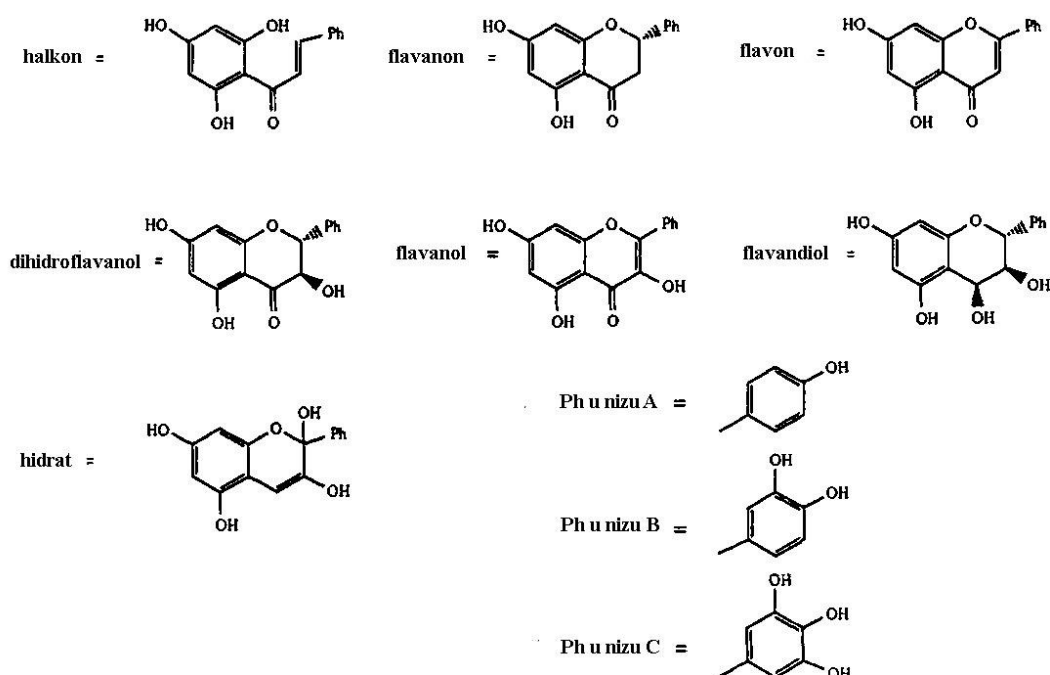
Kostur u strukturi ovih molekula čini flavonoid, čija su tri prstena A, B i C prikazana na slici 8. Ako se ovakvi spojevi izoliraju iz voća i povrća, onda nalazimo supstituirane vodikove atome na B prstenu s hidroski- ili metoski- skupinom te ih zovemo antocijanidini (65, 70, 74). Cvijeće, pa i ruže, imaju mogućnost glikozilacije antocijanidina te tako nastaju analogni spojevi antocijanini.¹ Podaci na slici 8 potvrđuju ovakve zaključke pošto su na njoj prikazani spojevi izolirani iz ruža i vidi se kako su spojevi najčešće supstituirani D-glukozom preko β-glikozidne veze. U određivanju boje ruže dominantni su 3,5-diglukozidi, dok ostali igraju manju ulogu. Ovakav primjer glikoziliranog antocijanina nalazi se na slici 9 kod kojeg je vidljiva O-glikozidna veza između šećera i flavonoidnog kostura antocijanina.



Slika 9: Prikaz glikoziliranog antocijanina, pelargonina

3.1. Biogeneza antocijanina

Slika 10: Biosintetski put flavonoida kod ruža²

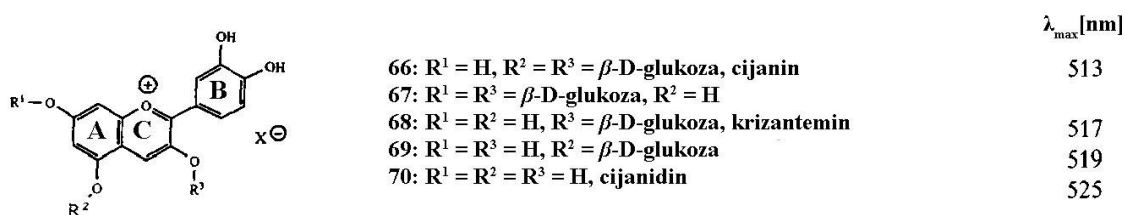
Slika 11: Legenda za sliku 10²

Slika 10 prikazuje biogenezu antocijanina koja će detaljnije biti objašnjena u sljedećim odjeljcima, dok je na slici 11 legenda za sliku 10. Biogeneza predstavlja sintezu pigmenta kod ruža te njihove biosintetske puteve. Podebljana strelica označava glavni put, tanka strelica označava sporedni put, dok isprekidana strelica predstavlja put koji još nije ustanovljen u ruža.

3.1.1. Pelargonin

Kod izolacije pigmenta (slika 8) iz ruža, pelargonin se nije mogao detektirati do 1929. godine,² dok se za njegovu prisutnost u pelargonijama i iglicama znalo odavno. Do sinteze pelargonidina dolazi samo u slučaju kada se redukcija dihidroflavonola A u flavandiol A ne inhibira, a pritom mora biti blokiran put nastanka flavanona B iz flavanona A. Na taj način je omogućena glikozilacija kako bi nastao pelargonin koji ružama daje ružičastu boju cvijeta.

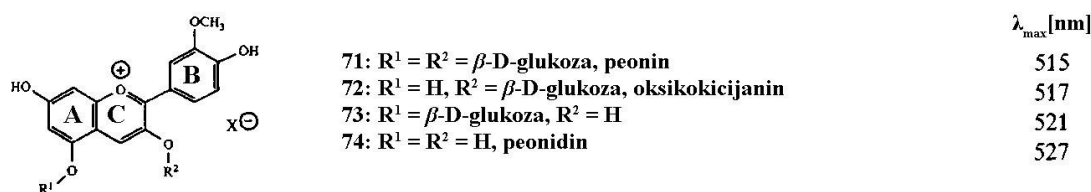
3.1.2. Cijanin



Slika 12: Antocijanini izolirani iz ruža i pripadajuće vrpce u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra (λ_{\max} / nm)²

Za ruže crvene boje zaslužan je pigment cijanin (slika 12). Put njegove sinteze veoma je eksprimiran, kao što se može vidjeti na slici 10. Ako se ne blokira reakcija nastajanja flavanona B, spoj koji se sintetizira je cijanidin, čijom pak glikozilacijom dolazimo do cijanina. Prilikom izolacije ovog spoja, može se uvidjeti kako je on često u pratnji sa krizanteminom (68). Ovaj spoj ružama daje posebnu, tamnocrvenu boju. Dok, kod ruža iz kojih je izoliran čisti cijanin, možemo zamijetiti kako su one ljubičaste boje. Dakle zaključuje se kako je cijanin prisutan i u crvenim i u ljubičastim ružama.

3.1.3. Peonin



Slika 13: Antocijanini izolirani iz ruža i pripadajuće vrpce u vidljivom dijelu elektromagnetskog spektra (λ_{\max} / nm)²

Sinteza peonina (slika 13) odvija se isto kao i sinteza cijanina iz kojeg ustvari sam peonin i potječe. Metiliranjem jedne hidroksilne skupine i hidrogeniranjem jedne acilne skupine, dobiva se peonin iz cijanina. Ovakav biosintetski put zahtjeva barem i malu prisutnost cijanina u svakoj ruži koja posjeduje peonin. Kao i kod cijanina, direktna sinteza iz aktivirane ferulinske kiseline (3-O-metilkafeoil CoA) se ne smije zanemariti bez obzira što ovakav put još nije istražen. Slika 14 prikazuje ružu koja ima jednu od najvećih koncentracija čistog peonina u svom cvijetu.



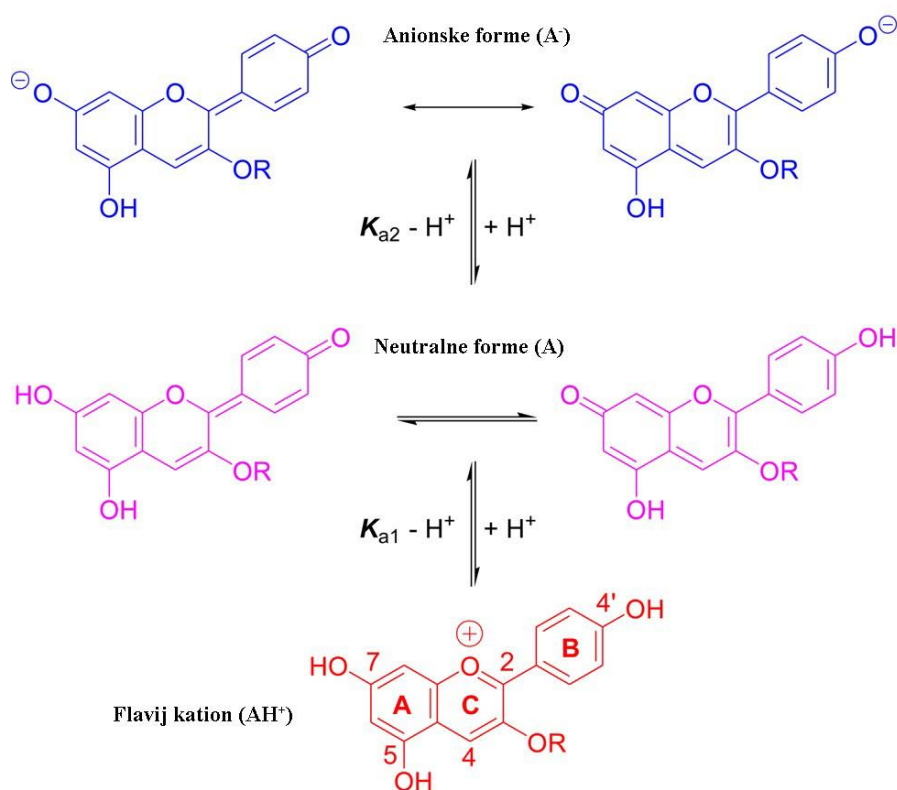
Slika 14: „Hansa“ grmolika ruža, *Schaum and van Tol*, 1905.²

3.2. Pigmenti šipka

Plodovi koji nastaju nakon cvatnje ruža istraživani su također kao i same latice kako bi se odredili pigmenti koji im daju boju. Šipak se pojavljuje u prirodi u raznim veličinama, oblicima i bojama. Unutrašnjost ploda je najčešće u živim bojama poput žute, narančaste, roze ili crvene, može biti smeđe boje ili čak crne. Analiza šipka je započela puno prije nego su strukture karotenoida ili antocijanina bile poznate, zbog interesa da oni moguće sadrže provitamin A₁. Kod izolacije iz ovog ploda teško je napraviti potpunu pročišćenje spojeva i identifikaciju istih, ali rezultati pokazuju dominaciju likopena i β,β -karotena od karotenoida, a krizantemina od antocijanina. Kod karotenoida je priča jasna te se za ove spojeve zna koje su boje, no antocijanini odnosno krizantemin nisu u potpunosti jasni. Šipak iz koje je izoliran krizantemin crne je boje prema čemu zaključujemo kako je potrebna daljnja studija crnog pigmenta, odnosno njegovih stabilizatora, kopigmenata, kako bi se objasnila ova neobična pojava, crno obojenje.

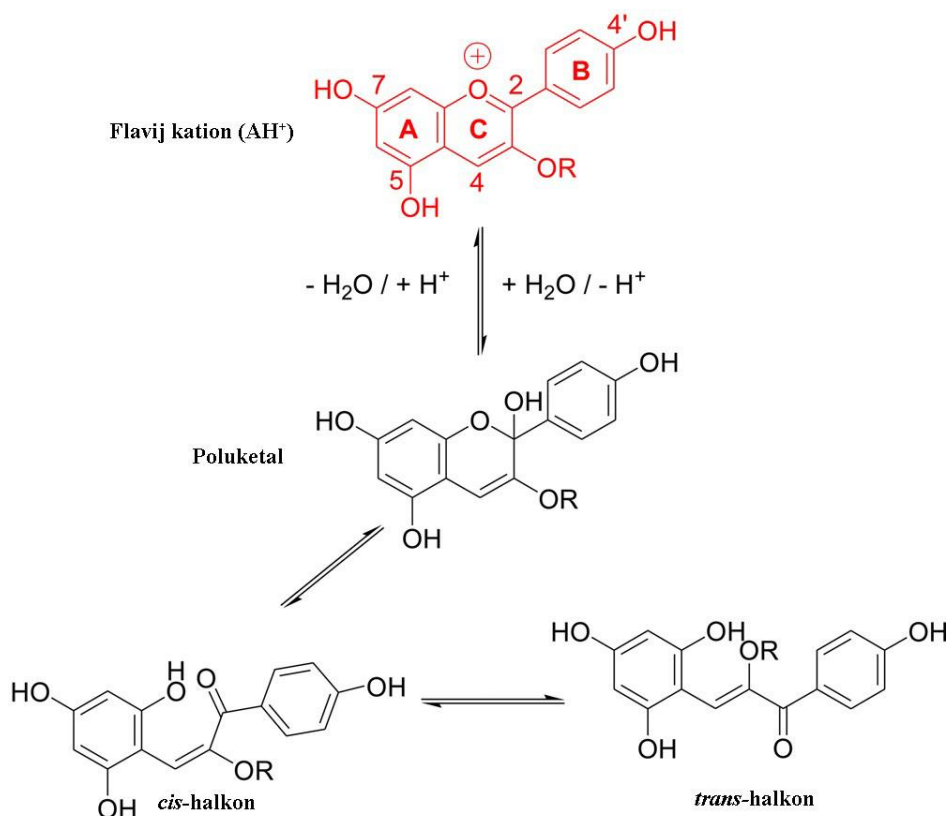
§ 4. STABILIZACIJA I KOPIGMENTACIJA

Struktura antocijanina opisana je u odjeljku 3, no mora se naglasiti kako oni mogu egzistirati u više formi koje su ovisne o pH vrijednosti sredine u kojoj se nalaze. Kada se govori o obojenim antocijaninima onda se oni nalaze u formi flavij kationa (AH^+), ali također mogu postojati u drugačijim, bezbojnim formama ili pak različito obojenim formama. Takva forma, flavij kation, podložna je hidrolizi i ovisna je o pH te egzistira pri jako niskom pH = 2. Biljke u svim svojim staničnim odjeljcima imaju raspon pH od 3 do 8 pa prema tome ovakva vrsta kationa u ovakvim uvjetima ne može opstati. U uvjetima blago kiselim, AH^+ forma prelazi u svoj neutralni oblik, a molekula gubi jedan od svojih najkiselijih fenolnih protona (C7-OH, C4'-OH, C5-OH). Sama molekula mora biti u svojoj neglikoziliranoj formi. Daljnjim porastom pH, molekula iz svoje neutralne forme (A), prelazi u pripadajuću anionsku formu, bazu (A^-). Ovakvim promjenama, vidljivim na slici 15, dolazimo do zaključka kako je flavij kation dikiselina i ima dvije pK_a vrijednosti koje otprilike iznose 4 i 7.



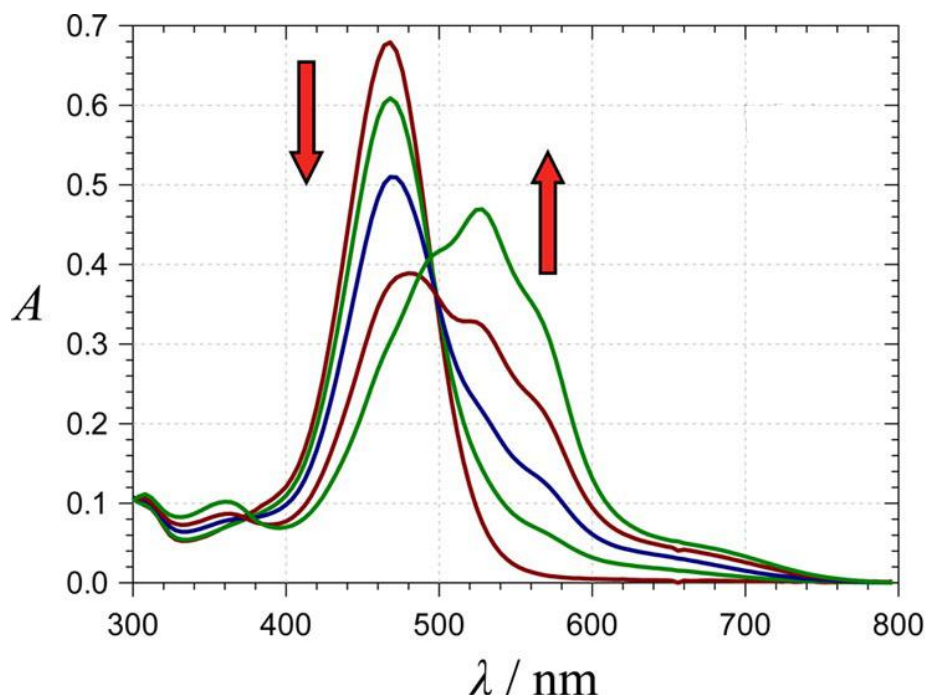
Slika 15: Prikaz promjena flavij kationa prilikom povećanja pH i boje koje odgovaraju pripadajućim strukturama¹

Na pH iznad 2 na flavij kation, također u svojoj neaciliranoj formi, može se adirati voda. Hidratacija se događa na C2 ugljikovom atomu i nastaje mješavina bezbojnih epimera, poluketala. Poluketal koji nastaje u brznoj je ravnoteži sa *cis* tautomerom dok je *cis* tautomer u sporijoj ravnoteži sa svojim *trans* tautomerom. Navedene promjene vidljive su na slici 16. Kao opis ovakvoj kompliciranoj hidrataciji flavij kationa koristi se skupna termodinamička konstanta koja u svojoj formuli sadržava sve promjene koje se posljedično hidratacije događaju.



Slika 16: Prikaz promjena flavij kationa prilikom adicije vode¹

Gore već spomenuto, boja cvijeta ovisi u kojoj se formi sama molekula nalazi, odnosno boja ovisi o pH i hidrolizi. Flavij kation obično biljkama daje crvenu boju, neutralna forma je ljubičaste boje dok je anionska forma plave boje. Prijenos protona uzrokuje (i) batokromni (crveni) pomak vrpce sa najnižom energijom u vidljivom dijelu spektra, (ii) širenje vrpce, (iii) smanjenje apsorbancije koje je poznato pod nazivom hipokromni efekt.¹³ Navedeni pomaci i promjene, prikazani su na slici 17. Nadalje, poluketalna forma kod hidrolize kationa je bezbojna, a *cis* i *trans* tautomeri su blago žute boje. Iz ovog zaključujemo kako antocijaninske forme, odnosno njihov π -konjugirani sustav, može apsorbirati u cijelom području vidljivog zračenja te djelomično u UV području (bezbojni pigmenti).



Slika 17: Ovisnost apsorbancije o valnoj duljini prilikom reakcije brzog nastajanja neutralne (A) i anionske forme (A^-) analoga antocijanina tijekom njegova dodavanja u pufer ($\text{pH} = 2 \rightarrow \text{pH} = 6$)¹

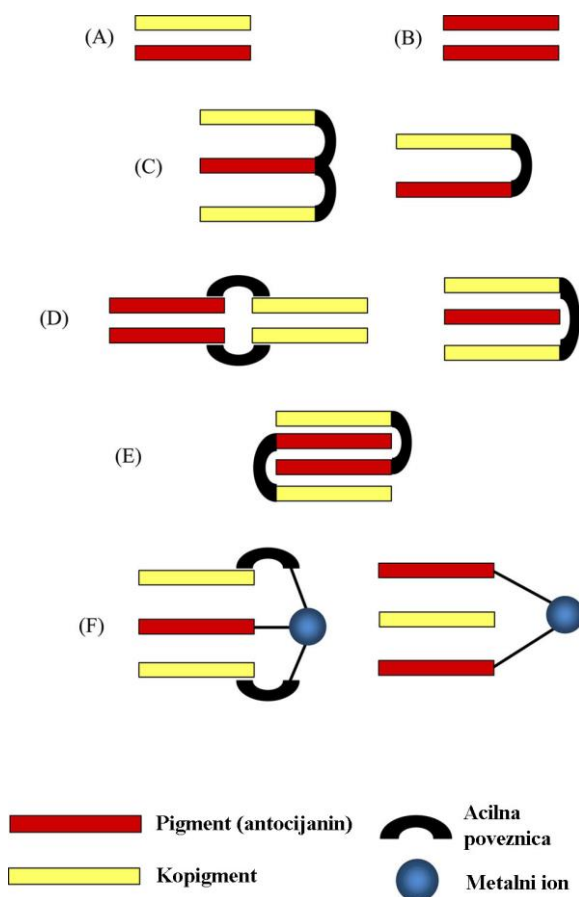
Sljedeće pitanje koje se može postaviti je koje od gore navedenih sudbina će zadesiti flavij kationa. Gubitak protona i hidroliza kationa međusobno kompetiraju. Termodinamički je povoljnija hidroliza, ali je veoma spora, dok je gubitak protona kinetički povoljnija reakcija. Poluketalna forma je termodinamički produkt, a forma A^- je dakle kinetički produkt veoma pH ovisan. Ovaj obojeni produkt će egzistirati nekoliko sekundi na niskom pH, dok će na pH oko 6 egzistirati duže, nekoliko minuta. Dakle zaključuje se da je AH^+ forma jedina forma koja je podložna hidrolizi, a porastom pH smanjuje se broj takvih molekula i reakcija adicije vode nije moguća.

4.1. Kopigmentacija

pH okoline utječe na molekulu pigmenta koja se u njoj nalazi. Zbog njegove promjene dolazi i do promjena u strukturi molekule, a promjenom strukture molekule dolazi do promjene funkcionalnosti. Kako bi se novonastala molekula stabilizirala dolazi do stupanja u interakciju s drugim molekulama i/ili ionima, dolazi do kopigmentacije. Dakle kopigmentacija može se definirati kao (i) nastajanje nekovalentnog kompleksa pigmenta ili njegovog derivata sa

kopigmentom i (ii) promjena optičkih svojstava uslijed nastajanja ovakve supramolekulske strukture.

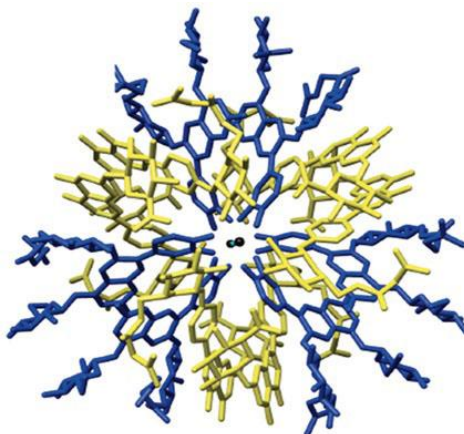
Kada se govori o spojevima koji mogu poslužiti kao stabilizatori pigmenata, u obzir možemo uzeti više od 10 000 spojeva.¹ Budući da lista ovih spojeva nije dostupna, oni su klasificirani i izrađene su kategorije u koje se kompleksi pigment-kopigment mogu svrstati. Ponajprije, potrebno je opisati kopigmente te njihove strukturne osobine. Kopigmenti, kao i pigmenti, moraju u svom kosturu imati π -konjugirani sustav koji će poslužiti u interakcijama aromatskih prstenova dajući supramolekulske vrste. Uz ovakvu vrstu interakcija, potrebne su i vodikove veze pa kopigmenti moraju imati donorske i akceptorske atome, kao što su npr. OH ili C=O. Prirodni spojevi koji najčešće služe stabilizaciji pigmenata su tanini, flavonoidi i fenolne kiseline. Flavonoidi zbog svoje trocikličke molekulske srži kroz koju se proteže π -konjugirani sustav u cjelini su okarakterizirani kao najučinkovitiji kopigmenti. Ovakva tri aromatska prstena prekursori su za mnoge spojeve pa tako i antocijanine te su shodno tome i opisani. U svojoj strukturi također imaju A, B i C aromatski prsten te poneku hidroksi ili keto skupinu.



Slika 18: Interakcija aromatskih prstenova antocijanina i njegovog kopigmenta¹

Priča o kopigmentaciji počinje 1916. godine¹⁴ kada su znanstvenici (referenca 14) proučavali djelovanje tanina i galne kiseline na promjenu nijanse pigmenta u vinu. Smatralo se kako je ova promjena karakteristična samo za taj pigment, no kasnijim otkrićem batokromnog efekta ovakva teza je pobijena. Anocijanini i njihove interakcije, intra- ili intermolekulske, proučavane su od tog trenutka. Kao što je već navedeno, kopigmentacija je koncentracijski ovisan proces koji je također osjetljiv na pH, temperaturu i otapalo. Nakon godina istraživanja ovakvih procesa, interakcija i složenih struktura, dobiven je model kojim se opisuju. Slika 18 prikazuje tipove slaganja pigmenta antocijanina sa samim sobom ili pak nekim kopigmentima i/ili metalnim ionom. Za razumijevanje A i B tipova kopigmentacija izvedeni su eksperimenti u kojima se koristila CD tehnika zbog svoje visoke osjetljivosti na kiralnost supramolekulske strukture nastale ili asocijacijom antocijanina i kopigmenta (A) ili asocijacijom dvaju molekula antocijanina (B). Kompleks A lakše je identificirati od kompleksa B pošto samoasocirane molekule antocijanina nije moguće pronaći u otapalima različitim od vode. Za takav kompleks, sile koje spajaju paralelne aromatske jezgre, jedne uz drugu, okarakterizirane su kao hidrofobne interakcije. Shodno tome smatra se povoljnijim spajanje aromatskih prstena pomoću π - π interakcija nego spajanje pomoću vodikovih veze akceptorskih i donorskih skupina.¹⁵

Prema slici 18, osim ovakve vrste kopigmentacije, boja se može stabilizirati na mnoge druge načine. Primjer C prikazuje intramolekulsku kopigmentaciju u aciliranom antocijaninu, dok primjer D prikazuje samoasocijaciju aciliranih antocijanina. Interkalacija u intermolekulskoj kopigmentaciji može se vidjeti na primjeru E, a kopigmentacija u metal-antocijanin kompleks može se vidjeti na primjeru F. Ako dolazi do acilacije, uvijek je riječ o kovalentnoj glikozidnoj poveznici između dviju molekula koja omogućava prisnije slaganje takvih planarnih struktura i nastajanje nekovalentne interakcije između njih. Metalni ioni koji stabiliziraju boju nekog pigmenta najčešće su magnezij(II), željezo(III) ili aluminij(III). Primjer kompleksa antocijanina, kopigmenta i metalnog centra nalazi se na slici 19 koja prikazuje kristalnu strukturu dobivenu rendgenskim zračenjem, a metalni centri koji su sadržani u njegovoj supramolekulskoj strukturi su ioni Fe^{3+} i Mg^{2+} .

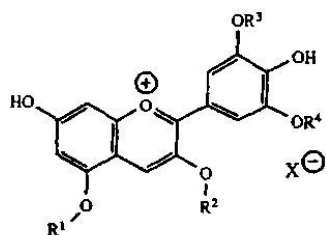


Slika 19: Kristalna struktura protocijanina dobivena difrakcijom rendgenskog zračenja¹⁶

Detaljnijim istraživanjem fenomena kopigmentacije, utvrđeno je kako ovaj proces utječe na ravnoteže reakcija hidratacije i prijenosa protona. Ako se kopigment nalazi u blizini pigmenta na koji će se vezati, on je jedan od najvažnijih faktora koji određuje koja vrsta će opstati. Utvrđeno je kako utjecaj kopigmenta utišava reakciju hidrolize, što znači da će izraženija reakcija biti ona kod koje se odvija prijenos protona.¹⁷ Prema tome, zaključuje se kako će cvijet zasigurno biti obojen budući da nema procesa hidrolize kojim nastaju spojevi čiji se apsorpcijski maksimum nalazi van vidljivog dijela spektra. Sam proces kopigmentacije neće biti toliko snažan, ako se pigment i kopigment nalaze u prisutnosti nekog organskog otapala, kao što je u vodenom mediju.

§ 5. PLAVA RUŽA

Biljke koje same sintetiziraju antocijanine i njegove derivate, potencijalno mogu biti izvor kompleksa pigment-kopigment koji će biti stabilan i određene boje, doduše neki od takvih slučajeva mogu se postaviti samo hipotetski.



75, $R^1 = R^2 = \beta\text{-D-glukoza}$, $R^3 = R^4 = \text{CH}_3$, malvin
Nije identificiran u laticama ruža

Slika 20: Pigment plave boje²

Mnogi uzgajivači i mnogi ljubitelji ruža sanjaju o plavoj ruži. U slučaju ruža, kompleks pigment-kopigment koji bi joj dao nebesko plavu boju još nije identificiran, odnosno o njemu se može pričati samo hipotetski. Postojeće ruže koje su se istraživale su crveno-ljubičaste ruže, zatim su uzgojene one koje bojom više naginju prema ljubičastoj ili lila, no ni jedno otkriće do danas ne može se pohvaliti plavom ružom.

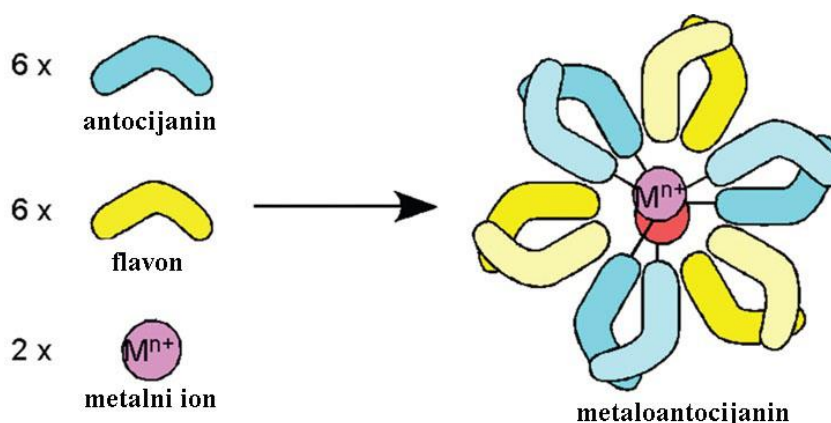
Nastajanje plavog pigmenta (slika 20) u ruža nije moguće. Slika 10 prikazuje hipotetski put nastajanja plavog pigmenta iz prekursora za ostale antocijaninske spojeve. Konvencionalne metode uzgoja plave ruže nisu prepune nade za takav uspjeh. Ako se kao baza uzme peonidin (74), za uspješan uzgoj potrebna je intramolekulska pigmentacija odnosno slaganje sa esterom disaharida i kafeinske kiseline. Zatim, ako se kao baza uzme cijanidin (70), potrebni su pogodni procesi glikozilacije, acilacije i formacije takvog kompleksa s određenim kationima.

Mnoga istraživanja su provedena kako bi se ustanovio stabilan kompleks pigmenta i kopigmenta uz uvjet da isti bude plave boje. Pigment i kopigment proučavani su u sustavima *in-vitro* koji oponašaju uvjete koji odgovaraju uvjetima u biljci. Naravno, znanstvenici su napravili i korak dalje i ispitali takve komplekse u različitim pH vrijednostima, različitim koncentracijama pigmenta i/ili kopigmenta te u različitim otapalima. Informacije dobivene ovakvim pokusima govore su o vezi strukture molekula i njihovoj efikasnosti. Potom, kopigmenti se mogu rangirati prema tome koliko dobro mogu stabilizirati malvin, pigment plave boje. Rangiranje tih spojeva dovelo je do zaključka kako bilo kakav dodatak u π -

konjugirani sustav na fenolni prsten (supstitucija elektron donorskih hidroksi ili metoksi skupina, konjugacija sa elektron odvlačećom keto skupinom ili konjugacija preko 2,3 dvostruke veze flavonoida) imaju pozitivan utjecaj na kopigmentaciju.

Odmaknemo li se malo od ruža, neke druge biljke imaju plave cvjetove. Takvo cvijeće ima također isti plavi pigment, ali uz neke druge uvjete, koji će nadalje biti navedeni, on je uspio zadržati svoju boju. Malvin spada u skupinu pigmenata koji se nazivaju antocijanini, a njihov sam naziv može se prevesti kao plavi cvijet. Doduše, u blago kiselim ili neutralnim uvjetima, plavo cvijeće uopće ne bi bilo plavo bez kopigmentacije. Bez pomoći drugih pigmenata, odnosno stabilizatora plave boje, oni bi bili žuti ili čak bezbojni. Kopigmentacija koja se najčešće pojavljuje u prirodi kada se govori o plavom ili ljubičastom cvijeću je bez metalnog iona kao stabilizatora, odnosno tip C sa slike 18. Acilacija ovakvih kompleksa odvija se gotovo na svakom prstenu iz strukture antocijanina te nastaju (poli)acilirani razgranati lanci. Također, kod nekih drugih biljaka dolazi do poliacilacije na samo jednom od prstena strukture antocijanina te se tako dobiva kopigment zbog kojeg dolazi do nastajanja kompleksa pigment-kopigment prema tipu E na slici 18. Takvi kompleksi izazivaju slaganje pigmenata i kopigmenata u supramolekulske strukture u kojima intra- i intermolekulske veze nastaju istovremeno. Povezanost između pigmenta i kopigmenta ne može se direktno dokazati pošto je teško izolirati kristale ovako labilnih molekulskih kompleksa koji bi se veoma lako podvrgnuli kristalografiji rendgenskog zračenja za dobivanje točne kristalne i molekulske strukture. Ono što je dobiveno, sheme slaganja, dobiveno je uporabom UV-vis apsorpcijske spektroskopije, cirkularnog dikroizma te spektroskopijom NMR.

Spomenuti kompleksi koji u svojoj strukturi imaju metalni ion, naravno pojavljuju se kod plavih cvjetova. Dakle, tip F kopigmentacije sa slike 18, metal-antocijanin kompleks jednostavno veže kopigment između dva antocijanina koji su povezani metalnim ionom ili je u specijalnom slučaju i kopigment vezan na metalni kation.

Slika 21: Shema nastajanja metal-antocijanin kompleksa¹⁶

Kompleks prikazan na slici 21 nastaje vezanjem antocijanina na metalni ion dok su kopigmenti u strukturu povezani nekovalentnim interakcijama na pigmente. Za nastajanje plavog obojenja u cvijetu, ovakav kompleks je od krucijalne važnosti, bez obzira što se plavi pigmenti mogu stabilizirati i bez metalnog iona u strukturi. Prilikom nastajanja metal-antocijanin kompleksa veoma dobro je poznata stehiometrija reaktanata koji ulaze u nj. Tri antocijanina vežu se na jedan metalni ion preko svog B prstena te se takav postupak ponovi, a u praznine koje nastaju ulaze kopigmenti koji se nekovalentno vežu na ostatak iz strukture antocijanina te tako dobivamo stehiometriju od $2 : 6 : 6 = \text{metal} : \text{antocijanin} : \text{kopigment}$. Ovakva struktura prvi put je izolirana 1992. godine iz biljke komelina pa je pigment prema tome nazvan komelin.¹⁸ Ovom izolacijom napravljen je veliki iskorak u istraživanjima prirodnog obojenja antocijaninima budući da je struktura pigmenta dobivena rendgenskim zračenjem iz kristalnog uzorka. Posljedično ovome, izolirane su mnoge strukture iz mnogih biljaka i detektirali su se ne samo metal-antocijanin kompleksi sa slike 21 već i mnogi drugi koji su spoj više tipova kopigmentacija ili pak kompleksi koji u svojoj strukturi imaju različite metalne ione za stabilizaciju boje.

Ruže, dakle trebaju imati jednu od gore navedenih kopigmentacija, odnosno uvjeta koji odgovaraju stabilizaciji plavog pigmenta. Ponovimo li, plavi pigment koji se ne nalazi u odgovarajućoj okolini uopće ne mora biti plave boje ili pak ako se ne stabilizira odgovarajućim kopigmentima, neće nastati supramolekulska struktura koji bi apsorpcijski odgovarala plavoj boji. Može se zatim još navesti kako u laticama ruža ima jako puno estera galne kiseline, koja na svom aromatskom prstenu ima tri hidroksilne skupine. Može li se ovakva struktura pojaviti

u B prstenu cijanidina? Osim ovakvih nekih konvencionalnih metoda transformacije strukture može se pribjeći genetskoj modifikaciji koja bi uvela odgovarajuće gene za plavi pigment iz neke već poznate srodne biljke. Možda su sve te ideje previše nategnute? No mora se istaknuti kako bi uzgajivač koji proizvede, na bilo koji način, ružu sa nebesko plavim cvjetovima zaradio milijune¹⁹ budući da takva ne postoji osim ako se koristi bijela ruža koja se oboja plavom bojom.

§ 6. ZAKLJUČAK

Studije o pigmentima iz ruža uvode svjetlo u dugu povijest uzgajanja ruža, no bez obzira na sve, ostaje još puno slagalice koje treba završiti. Istraživanja su pokazala kako postoji praznina u apsorpciji vidljivog dijela spektra postojećih sorta ruža. One koje su žute, njihova boja nije u potpunosti zasićena, dok bi crvenu boju mogao pojačati veći udio krizantemina u laticama. Ovo je priča samo o njihovoj boji, a zapravo, kada je riječ o tome, potrebno je govoriti o nečem puno kompliciranijem, o kopigmentaciji.

Analiza spojeva dobivenih iz latica ruža pokazali su kako količinski prednjače karotenoidi, dok antocijanina ima samo nekolicina u usporedbi s njima. Možda je ovdje zapravo riječ o tome kako antocijanini trebaju za procesom kopigmentacije pa posljedično tome nije potrebno puno spojeva ove klase. Pojam kopigmentacije dugo je bio tema koja se nije shvaćala, ali zajedno teorijska i eksperimentalna istraživanja dala su uvid u molekularno stanje prilikom nastajanja supramolekulske strukture. Tehnike koje su se koristile prilikom ovakvih istraživanja su definitivno jedne od modernijih (izotermalna titracijska kalorimetrija te NMR spektroskopija), a samim time, odnosno poboljšanjem tehnika koje će se koristiti ubuduće, povećat će se kvaliteta eksperimentalnog dijela istraživanja. Ovakve tehnike podupiru napredne teoretske izračune koji ustvari govore o stabilnosti kopigmentacijskog kompleksa, odnosno povezanosti između pigmenta i kopigmenta. Buduća istraživanja u ovom polju očekuju sljedeće proboje: (i) identifikacija faktora koji favoriziraju samoasocijaciju pigmenta ispred kopigmentacija ili obratno, (ii) karakterizacija metalom posredovane kopigmentacije te njegove termodinamičke efekte i (iii) bolje razumijevanje širenja vrpce u UV-vis spektru uslijed procesa kopigmentacije, što uvelike pridonosi samoj boji.

Ruža prikazana na slici 1 u Sažetku rada nažalost ne postoji, niti se trenutno može uzgojiti. Za uspješnu stabilizaciju plavog pigmenta potrebni su posebni uvjeti koji kod ruža nisu ostvareni, a sintetski put samog pigmenta nije omogućen. Promjenom ili enzima koji će pomoći u sintezi pigmenta ili uvjeta u kojima će se takav pigment stabilizirati ili oboje, uspjeh u uzgoju plave ruže je zagarantiran, a dotle se o njoj može samo sanjati.

§ 7. LITERATURNI IZVORI

- 1 P. Trouillas, J. C. Sancho-Garcia, V. De Freitas, J. Gierschner, M. Otyepka i O. Dangles, »Stabilizing and Modulating Color by Copigmentation: Insights from Theory and Experiment,« *Chem. Rev.* 116, pp. 4937-4982, 9 Ožujak 2016.
- 2 C. H. Eugster i E. Marki-Fisher, »The Chemistry of Rose Pigments,« *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 30, pp. 654-672, 27. Prosinac 1990.
- 3 Wheldon & Wesley, Codicote i Hitchin, The bibliography of K. L. Stock : The Rose Books, Velika Britanija, 1984.
- 4 S. Takaichi, M. Mimuro i Tomita Y, Carotenoids - Biological Functions and Diversity, Tokyo: Shokabo, 2006.
- 5 J. Yabuzaki, »Carotenoids Database: structures, chemical fingerprints and distribution among organisms,« Database, 1 Siječanj 2017. Dostupno: <https://doi.org/10.1093/database/bax004>. (Pokušaj pristupa 30 Srpanj 2018)
- 6 G. Britton, *Pure Appl. Chem.* 57, p. 701, 1985.
- 7 S. Mohanty, *Stereochemie des biologischen Ringschlusses bei Carotinoiden, Dissertation*, Zurich: Universitat Zurich, 1988.
- 8 F.-C. Czygan i A. Hager, Pigments in Plants, Stuttgart: Fischer, 1980.
- 9 E. Marki-Fischer i C. H. Eugster, *Neobjavljeni rezultati*.
- 10 V. F. Cataldo, J. Lopez, M. Carcamo i E. Agosin, »Chemical vs. biotechnological synthesis of C13-apocarotenoids: current methods, applications and perspectives,« *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100 (13), 7 Svibanj 2016.
- 11 A. L. Lehninger, D. L. Nelson i M. M. Cox, Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth edition, USA: W. H. Freeman and Company, 2008.
- 12 R. Willstätter i T. J. Nolan, *Liebigs Ann. Chem.* 1., p. 408, 1915.
- 13 F. Nave, V. Petrov, F. Pina, N. Teixeira, N. Mateus i V. de Freitas, »Thermodynamic and Kinetic Properties of a Red Wine Pigment: Catechin-(4,8)-Malvidin-3-O-Glucoside,« *J. Phys. Chem. B* 114 (42), pp. 13487-13496, 2010.
- 14 R. Willstätter i E. H. X. Zollinger, »Über Die Farbstoffe Der Weintraube Und Der Heidelbeere,« *II. Justus Liebigs Ann. Chem.* 412 (2), pp. 195-216, 1917.
- 15 T. Hoshito, U. Matsumoto i T. Goto, »Self-Association of Some Anthocyanins in Neutral Aqueous Solution,« *Phytochemistry* 20 (8), pp. 1971-1976, 1981.
- 16 K. Yoshida, M. Mori i T. Kondo, »Blue Flower Color Development by Anthocyanins: From Chemical Structure to Cell Physiology,« *Nat. Prod. Rep.* 26 (7), pp. 857-964, 2009.

-
- 17 T. Hoshino, U. Matsumoto, N. Harada i T. Goto, »Chiral Exciton Coupled Stacking of Anthocyanins: Interpretation of the Origin of Anomalous CD Induced by Anthocyanin Association,« *Tetrahedron Lett.* 22 (37), pp. 3621-3624, 1981.
- 18 K. Hayashi, Y. Abe i S. Mitsui, »Blue Anthocyanin from the Flowers of Commelina, the Crystallisation and Some Properties Thereof,« *Proc. Jpn. Acad.* 34 (6), pp. 373-378, 1958.
- 19 A. V. Roberts i J. Humphreys, *Rose Ann*, London, 1980.